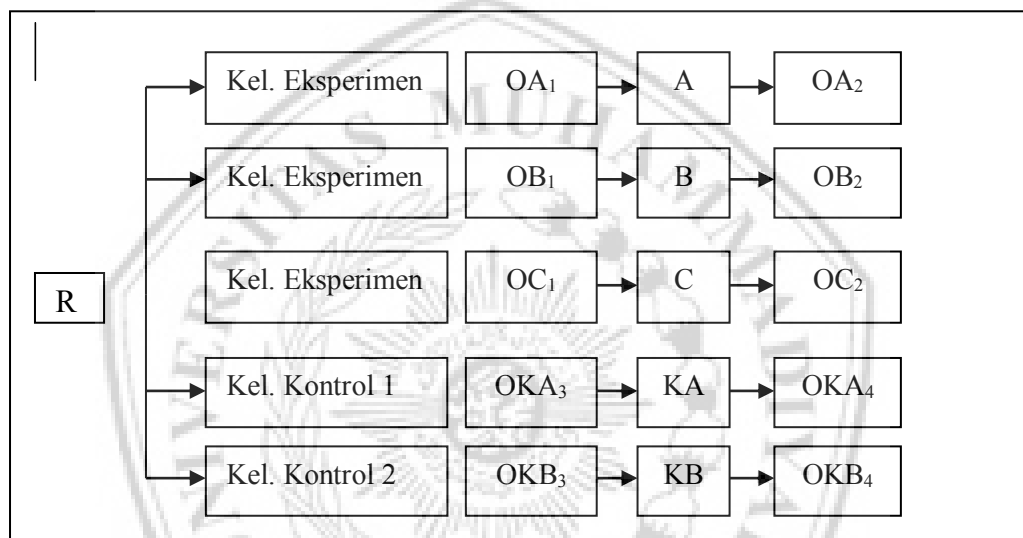


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen murni (*true experimental research*) dengan menggunakan desain *The Pretest-Posttest Control Group Design*.



Gambar 3.1 Desain Penelitian *Pretest Post test Only Control Group Design*

Keterangan:

- R : Randomisasi
- A : Ekstrak buah pare 20%
- B : Ekstrak buah pare 30%
- C : Ekstrak buah pare 40%
- KA : Kontrol Positif (*hand sanitizer A*)
- KB : Kontrol Negatif (Cuci tangan dengan air biasa)
- OA₁ : Observasi awal (sebelum perlakuan)
- OB₁ : Observasi awal (sebelum perlakuan)
- OKA₃ : Observasi awal (sebelum perlakuan)
- OKB₃ : Observasi awal (sebelum perlakuan)
- OA₂ : Observasi setelah perlakuan ekstrak buah pare 20%
- OB₂ : Observasi setelah perlakuan ekstrak buah pare 30%
- OC₂ : Observasi setelah perlakuan ekstrak buah pare 40%
- OKA₄ : Observasi setelah perlakuan kontrol positif
- OKB₄ : Observasi setelah perlakuan kontrol positif

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Desember 2018. Pembuatan ekstrak buah pare akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang. Pengujian penurunan jumlah koloni mikroba dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Malang.

3.3 Populasi, Teknik Sampling, dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroba pada seluruh mahasiswa warga kampus 3 UMM.

3.3.2 Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Simple Random Sampling*.

3.3.3 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah koloni mikroba pada 5 tangan mahasiswa kampus 3 UMM yang diambil dengan teknik *swab* sebelum dan sesudah perlakuan.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Jenis Variabel

3.4.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak buah pare. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini meliputi konsentrasi 20%, 30%, dan 40%.

3.4.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah penurunan jumlah koloni mikroba pada tangan. Jumlah koloni mikroba pada tangan dihitung sebelum perlakuan dan setelah perlakuan.

3.4.1.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah media biakan suhu inkubasi dan lama inkubasi.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi ekstrak buah pare adalah konsentrasi dari ekstrak buah pare yang akan digunakan untuk menguji penurunan jumlah koloni mikroba pada tangan.
2. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dari hasil ekstraksi senyawa aktif simplisia nabati maupun hewani menggunakan pelarut yang sesuai.
3. Jumlah koloni mikroba adalah sekumpulan mikroba yang mengelompok menjadi satu dan membentuk suatu koloni yang dihitung dari hasil pengambilan sampel pada tangan dengan teknik swab yang telah diinkubasi selama 2x24 jam.
4. Media biakan adalah media yang digunakan untuk membiakkan bakteri, berupa media NA.
5. Lama inkubasi adalah lama penyimpanan media nutrient agar yang telah ditanami mikroba di autoklaf.

6. Konsentrasi ekstrak buah pare adalah konsentrasi dari ekstrak buah pare yang akan digunakan untuk menguji penurunan jumlah koloni mikroba pada tangan.
7. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dari hasil ekstraksi senyawa aktif simplisia nabati maupun hewani menggunakan pelarut yang sesuai.
8. Jumlah koloni mikroba adalah sekumpulan mikroba yang mengelompok menjadi satu dan membentuk suatu koloni yang dihitung dari hasil pengambilan sampel pada tangan dengan teknik *swab* yang telah diinkubasi selama 2x24 jam.
9. Media biakan adalah media yang digunakan untuk membiakkan bakteri, berupa media NA.
10. Suhu inkubasi adalah suhu yang digunakan untuk menyimpan cawan petri yang sudah diinokulasi mikroba. Suhu yang digunakan 37°C.
11. Lama inkubasi adalah lama penyimpanan media nutrient agar yang telah ditanami mikroba di autoklaf.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

3.5.1.1 Menyiapkan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1 Alat

Alat	Jumlah
1. Autoklaf	1 buah
2. Bunsen	1 buah
3. <i>Magnetic stirrer</i>	1 buah
4. <i>Hot plate</i>	1 buah
5. LAF	1 buah
6. Cawan Petri	100 buah
7. Mortar martil	1 buah
8. Evaporator	1 buah
9. Botol kaca	5 buah
10. Blender	1 buah
11. Kertas saring	5 buah
12. Gelas kimia	5 buah
13. Spatula	1 buah
14. Botol <i>hand sanitizer</i>	3 buah
15. <i>Cotton bud</i>	100 buah
16. Gelas beaker	5 buah
17. Inkubator	1 buah
18. Tabung reaksi	100 buah
19. <i>Colony counter</i>	1 buah

Tabel 3.2 Bahan

Bahan	Jumlah
1. Serbuk NA	30 gram
2. Akuades steril	1710 ml
3. Kapas	1 <i>pack</i>
4. Buah pare	2 kg
5. Etanol 96%	1000 ml
6. Ekstrak buah pare	90 ml
7. NaCl 0,9%	1350 ml
8. Tangan	5 tangan

3.5.2 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari 1 faktor yaitu konsentrasi ekstrak buah pare. Penelitian terdiri dari 5 perlakuan dan masing-masing perlakuan menggunakan 5 kali ulangan. Jumlah ulangan didapatkan dari rumus.

$$(r-1)(t-1) \geq 15 \text{ (Kemas, 1991)}$$

Keterangan

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

r = replikasi

$$(r-1)(5-1) \geq 15$$

t = perlakuan

$$(r-1)(4) \geq 15$$

n = jumlah sampel

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5, sehingga dilakukan 5 pengulangan)}$$

$$n = t.r = 5.5 = 25$$

Jadi jumlah sampel dalam penelitian ini ada 25 sampel, jika ditambah dengan sebelum perlakuan maka jumlah seluruh sampel menjadi 50 sampel.

Berikut merupakan macam-macam perlakuan yang akan digunakan dalam penelitian:

A1= Kontrol negatif (cuci tangan dengan air biasa)

A2 = Kontrol positif (*hand sanitizer* A)

A3 = Konsentrasi ekstrak buah pare 20%

A4 = Konsentrasi ekstrak buah pare 30%

A5 = Konsentrasi ekstrak buah pare 40%

Banyak unit eksperimen pada petak RAL = banyak perlakuan x ulangan
 $= 5 \times 5 = 25$ unit eksperimen.

Ragam Unit Eksperimen:

A1 = A1₁, A1₂, A1₃, A1₄, A1₅

A2 = A2₁, A2₂, A2₃, A2₄, A2₅

A3 = A3₁, A3₂, A3₃, A3₄, A3₅

A4 = A4₁, A4₂, A4₃, A4₄, A4₅

A5 = A5₁, A5₂, A5₃, A5₄, A5₅

Denah RAL 1 faktor:

A2 ₂	A3 ₂	A4 ₂	A5 ₁	A1 ₁
A3 ₁	A4 ₃	A2 ₁	A5 ₃	A1 ₂
A4 ₄	A2 ₃	A3 ₃	A1 ₄	A5 ₅
A5 ₂	A2 ₄	A1 ₃	A3 ₃	A3 ₄
A3 ₃	A1 ₅	A2 ₅	A5 ₄	A4 ₅

Gambar 3.2 Denah Rancangan Acak Lengkap 1 faktor

Keterangan:

1, 2, 3, 4, 5 = Ulangan

3.5.3 Pelaksanaan Penelitian dan Alur Penelitian

3.5.3.1 Pelaksanaan Penelitian

1. Sterilisasi Alat

- a. Membungkus alat yang akan disterilisasi menggunakan kertas.
- b. Memasukkan alat yang akan digunakan ke dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C tekanan 2 atm.
- c. Mematikan pemanas dan menunggu tekanan sampai 0.
- d. Mengeluarkan alat dan bahan dari autoklaf.
- e. Alat dan bahan siap untuk digunakan.

2. Pembelian Buah Pare

Buah pare dibeli dari pasar Landungsari Malang. Buah pare yang digunakan adalah pare jenis pare gajah. Buah pare dipilih yang terlihat segar dan utuh. Buah pare yang sudah dibeli dibawa ke laboratorium untuk dijadikan ekstrak.

3. Pembuatan Ekstrak Buah pare

- a. Menimbang simplisia atau bahan segar yaitu pare yang akan diekstraksi.
- b. Menghaluskan bahan segar menggunakan mortal martil.
- c. Memindahkan bahan yang telah dihaluskan ke sebuah wadah tertutup.
- d. Menambahkan pelarut etanol 96% ke dalam wadah yang berisi simplisia yang telah dihaluskan sampai simplisia terendam etanol dan menyimpan selama 24 jam.
- e. Menyaring larutan menggunakan kain saring.

- f. Memindahkan hasil saringan ke dalam evaporator dan memasang labu pada evaporator.
- g. Melakukan destilasi pada suhu titik didih pelarut sampai tertinggal cairan pekat pada evaporator.
- h. Memindahkan cairan pekat ke dalam botol kaca yang telah disterilkan.

4. Pembuatan Media *Nutrient Agar*

- a. Menimbang NA sebesar 30 gram dan akuades steril sebanyak 1500 ml.

$$\frac{\sum \text{cawan petri} \times \text{standart volume}}{1000} \times \text{standart media}$$

$$\frac{100 \times 15}{1000} \times 20 = 30 \text{ gram}$$

$$\sum \text{cawan petri} \times \text{standart volume}$$

$$10015 \text{ ml} = 1500 \text{ ml}$$

- b. Memasukkan serbuk NA yang telah ditimbang, akuades steril, *magnetic stirrer* ke dalam erlenmeyer.
- c. Menutup erlenmeyer menggunakan kapas.
- d. Menghomogenkan erlenmeyer di atas *hot plate* tanpa pemanas selama 20-30 menit.

5. Pembuatan *Hand sanitizer* Alami

- a. Menyiapkan 3 buah gelas kimia yang akan digunakan sebagai wadah dalam pembuatan *hand sanitizer*.
- b. Memberi label formula 1, 2, dan 3 pada 3 buah gelas kimia.
- c. Menuangkan ekstrak buah pare pada masing-masing gelas yang telah diberi label.

Konsentrasi ekstrak buah pare didapatkan berdasarkan rumus:

$$V1.N1 = V2. N2$$

Keterangan:

V1 = Volume yang dicari

N1 = Konsentrasi awal (100% larutan)

V2 = Volume yang diinginkan (ditentukan 100 ml)

N2 = Konsentrasi yang diinginkan

1. Konsentrasi 20% ekstrak

$$100 . V1 = V2 . N2$$

$$100 . V1 = 100 . 20$$

$$V1 = 2000 : 100 = 20 \text{ ml}$$

2. Konsentrasi 30% ekstrak

$$100. V1 = V2 . N2$$

$$100 . V1 = 100 . 30$$

$$V1 = 3000 : 100 = 30 \text{ ml}$$

3. Konsentrasi 40% ekstrak

$$100 . V1 = V2 . N2$$

$$100 . V1 = 100 . 40$$

$$V1 = 4000 : 100 = 40 \text{ ml}$$

- d. Mencampurkan akuades steril pada masing-masing gelas kimia.

Agar konsentrasi yang didapatkan 100%, maka diperlukan penambahan jumlah akuades yang berbeda pada masing-masing konsentrasi.

1. Konsentrasi ekstrak 20% = 80 ml.

2. Konsentrasi ekstrak 30% = 70 ml.
3. Konsentrasi ekstrak 40% = 60 ml.
- e. Mengaduk campuran ekstrak dan akuades steril sampai merata.

6. Uji Efektivitas *Hand sanitizer*

Pengujian efektivitas *hand sanitizer* alami dilakukan dengan menghitung jumlah koloni mikroba sebelum dan sesudah diberi perlakuan. Pengambilan sampel pada tangan dilakukan dengan teknik *swab* (ulasan). Berikut merupakan langkah-langkah dalam menguji efektivitas *hand sanitizer*:

a. Sebelum Perlakuan

1. Menyiapkan responden penelitian yang telah dipilih untuk mengikuti penelitian.
2. Mengambil sampel sebelum perlakuan dengan menyapukan *cotton bud* steril yang telah direndam dalam NaCl 0,9% ke telapak tangan.
3. Memasukkan *cotton bud* ke dalam tabung berisi NaCl 0,9 % sebesar 9 ml (pengenceran 10^{-1})
4. Membiarkan tangan selama 15 menit untuk perlakuan selanjutnya.

b. Sesudah Perlakuan

1. Menyiapkan responden penelitian yang telah dipilih untuk mengikuti penelitian.
2. Memberi perlakuan pada tangan setiap responden. Misalnya untuk tangan yang diberi perlakuan *hand sanitizer* maka tangan responden disemprot menggunakan *hand sanitizer*. Penyemprotan dilakukan sebanyak 3 kali semprot (*spray*).

3. Mengambil sampel dengan menyapukan *cotton bud* steril yang telah direndam dalam NaCl 0,9% ke telapak tangan.
4. Memasukkan *cotton bud* ke dalam tabung reaksi berisi NaCl 0,9 % sebesar 9 ml (pengenceran 10^{-1})

7. Perhitungan Jumlah Koloni Mikroba: Uji TPC (*Pour Plate*)

1. Mengambil 1 ml dari pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam tabung berisi NaCl 0,9% sebesar 9 ml (pengenceran 10^{-2}).
2. Mengambil 2 ml dari pengenceran 10^{-2} , menginokulasikan 1 ml larutan ke dalam cawan petri yang telah disiapkan, sedangkan 1 ml dimasukkan ke dalam tabung berisi NaCl 0,9% sebesar 9 ml (pengenceran 10^{-3}).
3. Mengambil 1 ml dari pengenceran 10^{-3} dan menginokulasikan ke dalam cawan petri yang telah disiapkan.
4. Menuangkan media NA ke dalam cawan petri yang telah berisi larutan NaCl dan menggoyangkan secara memutar agar tercampur secara merata.
5. Cawan petri dimasukkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2x 24 jam.
6. Menghitung jumlah koloni mikroba menggunakan *colony counter*. Jumlah koloni per gram sampel dihitung dengan menggunakan rumus dan untuk melaporkan digunakan standar SPC.

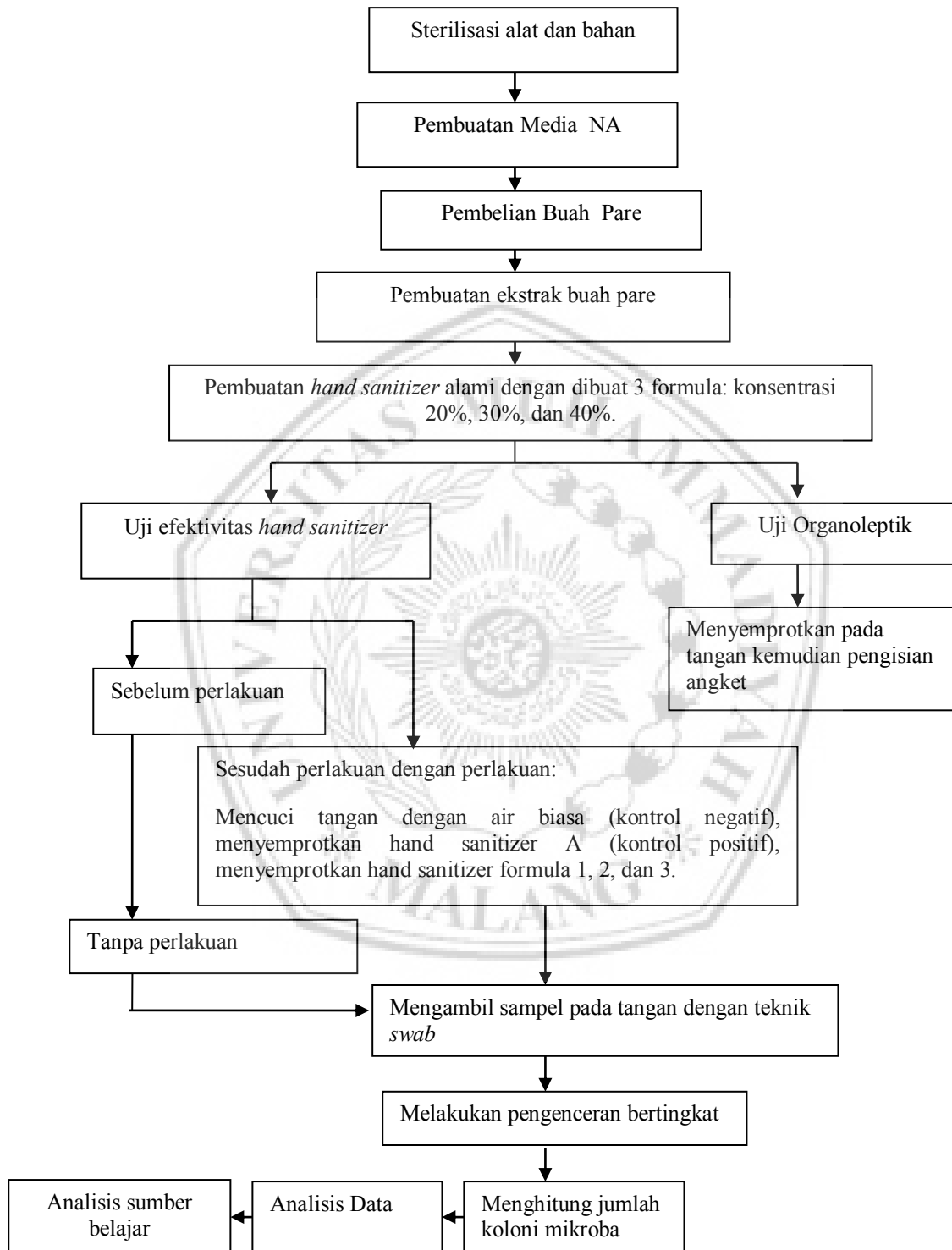
8. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk mengetahui kualitas dari sediaan *hand sanitizer* yang telah dibuat. Uji organoleptik dilakukan dengan menyemprotkan *hand sanitizer* ke tangan responden kemudian pengisian angket. Uji organoleptik

yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji hedonik (uji kesukaan) terhadap 25 panelis dengan kategori panelis semi terlatih yang berasal dari mahasiswa Universitas Muhammadiyah Malang. Panelis yang dipilih adalah panelis representatif, yaitu panelis yang sudah mengenal dan pernah menggunakan produk *hand sanitizer*, tidak dalam keadaan sakit (tidak flu, tidak menderita penyakit kulit), tidak menggunakan produk kosmetik di tangan serta mempunyai kepekaan (sensitivitas) yang normal. Parameter yang dilihat meliputi tingkat kelembaban, warna, dan aroma.



Berikut merupakan alur penelitian yang akan dilakukan:



Gambar 3.3 Bagan Alur penelitian

3.6 Metode Pengumpulan Data

3.6.1 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini dilakukan dengan cara mengisi lembar observasi dengan hasil perhitungan jumlah koloni mikroba pada cawan petri yang berisi sampel. Perhitungan jumlah koloni mikroba dilakukan menggunakan *colony counter* yang selanjutnya data ditabulasikan pada tabel.

Tabel 3.3 Data Hasil Penelitian

Jenis Sampel	Jenis Perlakuan	Jumlah Koloni Mikroba(CFU/ml)					Total	Rata-rata
		Ulangan						
		I	II	III	IV	V		
Pre test	A1							
Post test								
Pre test	A2							
Post test								
Pre test	A3							
Post test								
Pre test	A4							
Post test								
Pre test	A5							
Post test								
Jumlah								

3.7 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan dalam penelitian ini meliputi uji ANCOVA dan statistika deskriptif. Uji ANCOVA digunakan untuk menganalisis efektivitas dari ekstrak buah pare. Sebelum melakukan uji anкова dilakukan uji prasyarat terlebih dahulu. Uji prasyarat tersebut meliputi uji normalitas dengan menggunakan uji Kolmogrov Spirnov dan uji homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Jika hasil uji prasyarat menunjukkan hasil bahwa data berdistribusi normal dan memiliki varian yang sama maka dilanjutkan uji ANCOVA. Jika hasil menunjukkan adanya pengaruh perlakuan maka dilanjutkan uji DMRT (*Duncan's*

Multiple Range Test) untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan. Uji statistika deskriptif dengan menggunakan nilai rata-rata dilakukan untuk menganalisis data hasil uji organoleptik.

